

基于 SCoT 标记血叶兰资源的亲缘关系分析

郑涛¹, 蔡坤秀¹, 杨俊杰¹, 卢永春¹, 陈振东¹, 翁文²

1. 福建省热带作物科学研究所, 福建 漳州 363000

2. 闽南师范大学, 福建 漳州 363000

摘要:目的 采用 SCoT 分子标记方法对血叶兰 *Ludisia discolor* 及其近缘属植物资源进行亲缘关系及 DNA 指纹图谱构建, 从分子水平对血叶兰及其近缘属种质进行区分。方法 使用正交设计方法, 对 SCoT-PCR 反应体系进行优化, 筛选适合血叶兰的反应体系、最佳退火温度及 SCoT 引物。以供试的 12 份种质资源为材料, 利用筛选的引物对其进行分析, 用 POPgene 计算材料间的遗传多样性系数, NTSYS 软件进行聚类分析, 并构建 DNA 指纹图谱。结果 获得适用于血叶兰的 SCoT-PCR 反应体系, 筛选出 12 条多态性好的血叶兰 SCoT 引物, 多态性比率为 98.98%。根据 Nei's 遗传相似系数, 在相似系数为 0.45 时, 12 份种质资源可被分为 3 个分支。其中, 斑叶兰与 7 份血叶兰种质归为 I 类, 3 份金线兰种质为 II 类, 而绿石蚕单独聚为 III 类。利用 SC8 引物构建的 DNA 指纹图谱即可将 12 份材料鉴别开。结论 12 份血叶兰及其近缘属种质具有丰富的遗传多样性, 构建的 DNA 指纹图谱可用于血叶兰及其近缘属品系鉴定。

关键词: 血叶兰; SCoT 标记; 体系优化; 亲缘关系; 指纹图谱

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-4011-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.021

Relationship analysis for *Ludisia discolor* germplasm resources based on SCoT molecular marker

ZHENG Tao¹, CAI Kun-xiu¹, YANG Jun-jie¹, LU Yong-chun¹, CHEN Zhen-dong¹, WENG Wen²

1. Fujian Institute of Tropical Crops, Zhangzhou 363000, China

2. Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China

Abstract: Objective To make a distinction between *Ludisia discolor* and its relatives genus in molecular level, SCoT markers were employed to assess the genetic relationship and construct the DNA fingerprint. **Methods** Orthogonal design method were carried out to optimize the suitable SCoT-PCR reaction system based on five factors. The optimum annealing temperature and SCoT primers were also screened. The 12 germplasm resources were used as materials, the screened primers were selected to analyze the genetic relationship of 12 materials. POPGENE was used to calculate the genetic diversity, NTSYS was performed to analyze cluster, and DNA map was constructed. **Results** The optimized SCoT-PCR reaction system was constructed and a total of 12 rich bands were screened out as the primers of SCoT molecular marker with polymorphism ratio of 98.98%. According to Nei's genetic similarity coefficient, a total of 12 materials were divided into three cluster when coefficient was 0.45. *Goodyera schlechtendaliana* was in category I with seven *L. discolor* lines, indicating that these samples had close relationship. In category II, there were three samples came from *Anoectochilus roxburghii*. Moreover, a green *L. discolor* sample was alone clustered into category III. The DNA fingerprint map by the SC8 primer could identify the 12 materials. **Conclusion** There are rich genetic diversities in 12 samples of *L. discolor* and its relatives genus, and the construction of DNA fingerprint map provides a theoretical basis for the identification of *L. discolor* and its relatives genus, which were tested in this study. **Key words:** *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich.; SCoT marker; reaction system optimization; genetic relationship; DNA fingerprint map

血叶兰 *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich. 别 有兰科血叶兰属植物。在我国主要分布于福建、广东、海南、广西和云南等地, 生长于山坡或沟谷常

收稿日期: 2019-12-09

基金项目: 漳州市科技重大专项项目 (zz2018ZD20); 广东省现代农业科技攻关项目 (DzxQY008); 福建省星火项目 (2019S0031); 福建省林业科技推广项目 (2019TG08)

作者简介: 郑涛, 副研究员, 从事食药两用观赏植物资源研究。Tel: (0596)2615307 E-mail: 16717125@qq.com

绿阔叶林下阴湿处,属多年生草本植物。血叶兰因具有滋阴润肺、清热凉血、健脾安神等功效而在南方地区广为采用^[1],具有悠久的药用历史^[2]。随着血叶兰药用价值不断被开发,种质遗传多样性逐渐丰富,加上血叶兰的生物学性状与金线莲等兰科植物具有相似之处,曾有研究将其归为同一种植物或同为开唇兰属植物^[3-4],然而,经实地调查和鉴定,本研究参试血叶兰在叶色,根茎,性味及功效与兰科血叶兰属植物血叶兰一致^[5-6]。SCOT 分子标记能够对 ISSR 和 RAPD 进行有效补充,且遗传信息丰富,重复性好,操作简单,已广泛应用于多种植物的遗传多样性,亲缘关系和遗传图谱等分析^[7-9]。因此,采用分子标记技术对血叶兰资源进行遗传多样性和亲缘关系鉴定,从分子水平准确定位血叶兰资源的品种特性和进化地位,可为血叶兰的合理开发利用及人工杂交育种工作提供理论指导。

血叶兰现有的研究多见于生物学特性、生药鉴定、显微结构及性状描述、组培快速繁殖及人工栽培等资源调查和开发利用阶段,未见血叶兰属植物分子标记方法建立及其利用分子标记进行种质资源亲缘关系分析,遗传多样性和指纹图谱构建等方面的研究报道。且血叶兰在外观上常被误认为金线

莲,曾有报道将其归为同种植物^[3-4],因此从分子水平对其亲缘关系进行鉴定至关重要。本研究建立最佳的血叶兰属植物 SCoT 分子标记 PCR 扩增体系,筛选合适的 SCoT 引物,并基于该反应体系探讨 12 份血叶兰及其近缘属植物的遗传多样性和指纹图谱构建,为血叶兰植物的分子鉴定提供理论指导。

1 材料与仪器

1.1 材料

实验所用兰科植物材料共 12 份(表 1),采样地点为福建省热带作物科学研究所种植资源圃内,由福建省热带作物科学研究所郑涛副研究员鉴定。优化体系和引物筛选所用的植物材料为血叶兰 *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich. 中的绿单银^[10]。从田间分别采集 12 份植物材料的新鲜叶片,用无菌水清洁叶片后于-80 ℃冰箱内保存备用。参考已报道 SCoT 分子标记引物^[8],委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 仪器

DNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Ex Taq™ Version 2.0 扩增酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;琼脂糖粉末购自 BIOWEST

表 1 供试样品清单及特征描述

Table 1 Morphological detail of samples used in this study

编号	名称	形态特征					
		茎秆颜色	叶形	叶面色	叶脉数及颜色	叶背色	花期
1	绿单银 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. LDY.	墨绿色	卵圆形	绿色	1 条银白色	淡红色	12~2 月份
2	绿五银 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. LWY.	墨绿色	卵圆形	黑绿色	5 条金红色	淡红色	1~3 月份
3	绿密银 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. LMY.	墨绿色	卵圆形	黑绿色	5 条银白色主脉;不规则 银白色细脉	淡红色	1~3 月份
4	绿密金 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. LMJ.	墨绿色	卵圆形	黑绿色	5 条金红色主脉;不规则 金红色细脉	淡红色	1~3 月份
5	红单金 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. HDJ.	墨绿色	卵圆形	黑绿色	1 条金红色主脉	淡红色	12~2 月份
6	红五金 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. HWJ.	黑红色	卵圆形	黑绿色	5 条金红色主脉;不规则 光泽细脉	淡红色	1~3 月份
7	红密金 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. HMJ.	黑红色	卵状长圆形	墨绿色	5 条金红色主脉;不规则 金红色细脉	淡红色	2~4 月份
8	绿石蚕 <i>L. discolor</i> (Ker-Gawl.) A. Rich. LSC.	绿色	卵状长圆形	绿色	5 条白色主脉;不规则白 色细脉	淡绿色	10~11 月份
9	台湾银线兰 <i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata		卵形或卵圆形	绒毛状墨绿色	白色网脉	红色	10~11 月份
10	浙江金线兰 <i>A. zhejiangensis</i> Z. Wei et Y. B. Chang	淡红褐色	宽卵形至卵圆形	天鹅绒状绿紫色	金红色网脉	淡紫红色	7~9 月份
11	斑叶兰 <i>Goodyera schlechtendaliana</i> Rchb.f.	绿色	卵状披针形	绿色	白色不规则点状斑纹	淡绿色	8~10 月份
12	越南金线莲 <i>A. roxburghii</i> VN.		偏斜的卵形	黑绿色	金红色网脉	淡绿色	7~8 月份

公司。超微量紫外/可见光分光光度计 Nano Drop ND1000 spectrophotometer(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, 美国); 梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); EPS301 电泳仪(美国 Amersham 公司)。

2 方法

2.1 植物 DNA 提取与检测

DNA 提取采用植物基因组 DNA 提取试剂盒, 具体步骤参考说明书。所提 DNA 均用 Nano Drop ND1000 spectrophotometer 测定浓度和纯度, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。

2.2 SCoT-PCR 扩增体系优化

按照正交设计分别对反应体系中 Mg^{2+} 、dNTP、Taq 酶、primer 和 DNA 的添加量进行优化。每个因素设计 4 个水平, 共计 16 个处理(表 2), 每个处理 3 个重复, 对血叶兰 SCoT-PCR 扩增体系进行优化。

2.3 PCR 扩增程序及反应产物检测

PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 循

环 35 次; 72 °C 延伸 5 min。扩增反应结束后, 取 5 μ L 扩增产物在含 Gold View 染料的 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 电泳结束后在凝胶成像系统上采集图像。

2.4 条带记录与统计分析

电泳条带统计通过 Quantity One 软件进行识别, 显示有条带标为“1”, 而相对位置没有条带的标为“0”, 建立 0/1 矩阵。通过 NTSYSpc 2.10e 软件进行相似性(Similarity)分析, 形成相似系数矩阵, 按非加权组平均法方法(unweighted pair group method arithmetic averages, UPGMA)进行聚类分析。通过 Popgene 32 软件, 可计算多态性位点百分率(percentage of polymorphic loci, PPL), 香农指数(Shannon's information index)、基因多样性指数(Nei's gene diversity index)、观测等位基因数(N_a , Observed number of alleles)、有效等位基因数(N_e)、Nei 遗传一致度和 Nei 遗传距离等参数。通过正交助手对 SCoT-PCR 扩增体系进行评价, 获得最优组合。

表 2 血叶兰 SCoT-PCR 反应体系正交设计

Table 2 Orthogonal design in SCoT-PCR reaction system of *L. discolor*

编号	$Mg^{2+}/(mmol \cdot L^{-1})$	dNTP/(mmol \cdot L $^{-1}$)	Taq/U(25 μ L)	引物/(μ mol \cdot L $^{-1}$)	DNA/ng	评分
1	1.5	0.1	0.5	0.75	10	1
2	1.5	0.2	1.0	1.00	30	10
3	1.5	0.3	1.5	1.25	50	13
4	1.5	0.4	2.0	1.50	70	11
5	2.0	0.1	1.0	1.25	70	4
6	2.0	0.2	0.5	1.50	50	15
7	2.0	0.3	2.0	0.75	30	6
8	2.0	0.4	1.5	1.00	10	9
9	2.5	0.1	1.5	1.50	30	3
10	2.5	0.2	2.0	1.25	10	8
11	2.5	0.3	0.5	1.00	70	16
12	2.5	0.4	1.0	0.75	50	7
13	3.0	0.1	2.0	1.00	50	2
14	3.0	0.2	1.5	0.75	70	5
15	3.0	0.3	1.0	1.50	10	12
16	3.0	0.4	0.5	1.25	30	14
K_1	8.750	2.500	11.500	4.750	7.500	
K_2	8.500	9.500	8.250	9.250	8.250	
K_3	8.500	11.750	7.500	9.750	9.250	
K_4	8.250	10.250	6.750	10.250	9.000	
R	0.500	9.250	4.750	5.500	1.750	

3 结果与分析

3.1 血叶兰 SCoT-PCR 扩增体系的建立

采用正交助手设计 5 因素 4 水平的 L_{16} 正交组合, 具体见表 2, PCR 扩增结果经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后图像见图 1。以条带多态性好, 条带清晰及亮度为依据, 对 16 个组合依次进行评分, 最好的为组合

11 (评分为 16 分), 最差的为组合 1 (为 1 分)。正交助手软件选择直观分析, 假设不存在因素间的相互作用, R 值越大则该因素对反应体系的影响程度越大, 因此, 本研究中 dNTP 对 SCoT 扩增反应体系最为明显, 其次是引物浓度, 再者是 Taq 酶。DNA 含量及 Mg^{2+} 浓度对体系的影响程度最小。

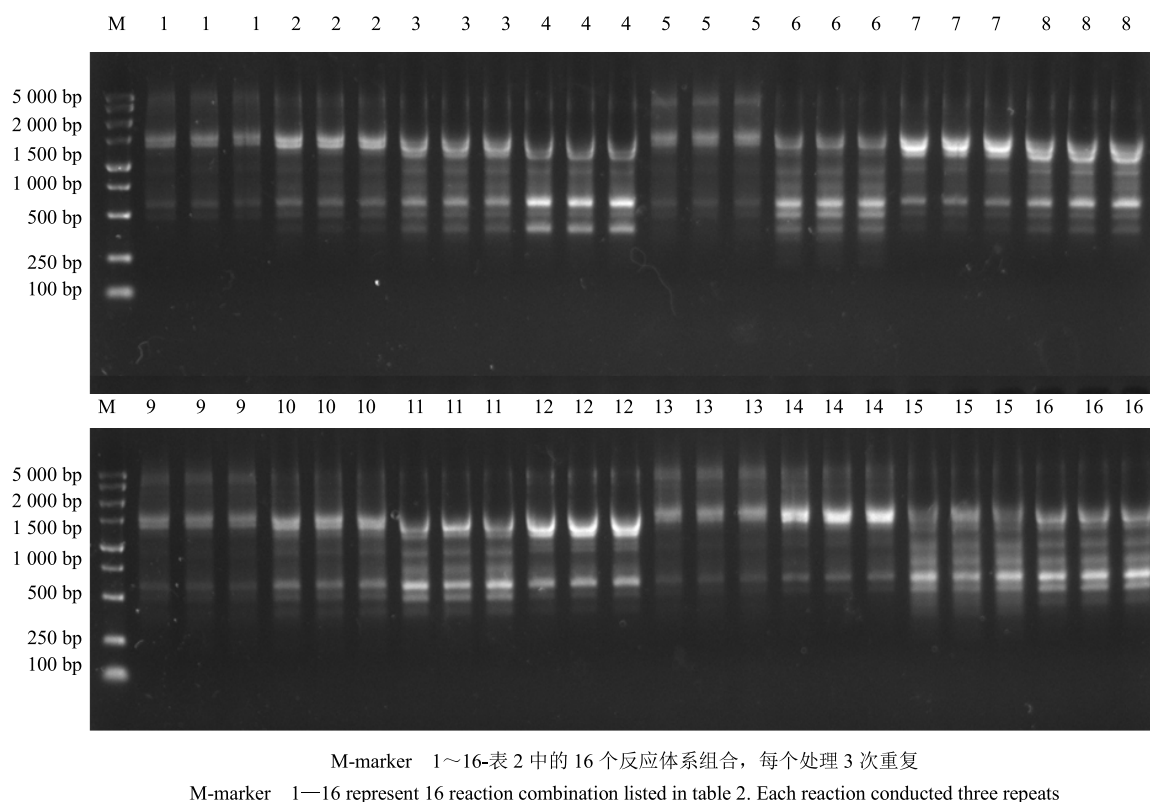


图 1 SCoT-PCR 扩增体系的正交组合电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results for SCoT-PCR amplification of orthogonal combination

3.2 血叶兰 SCoT 分子标记最适退火温度及最佳引物的筛选

根据正交试验结果选择最佳反应体系对退火温度进行梯度试验, 设定 12 个温度梯度: 45.0、45.5、46.0、47.0、48.2、49.4、50.6、51.8、53.0、54.0、54.5、55.0 °C。除退火温度不同外, 反应程序与正交试验时相同。模板采用 1 号样品绿单银, 引物选择的是 SC1。如图 2 所示, 温度越高引物的多态性越差, 温度越低则条带较为模糊, 因此本研究选择 49.4 °C 作为最适退火温度。从 40 条 SCoT 引物中筛选到 12 条适合兰科植物扩增的 SCOT-PCR 引物 (图 3), 引物序列见苏亚春等^[8]实验内容。共扩增 94 条谱带, 多态性比率为 98.94%。其中, 引物 SC8 扩增的谱带最多, 多态性比率 100%, 引物 SC39 扩增的多态性比率为 88.89%, 其余引物扩增的多态性比率均为 100%。

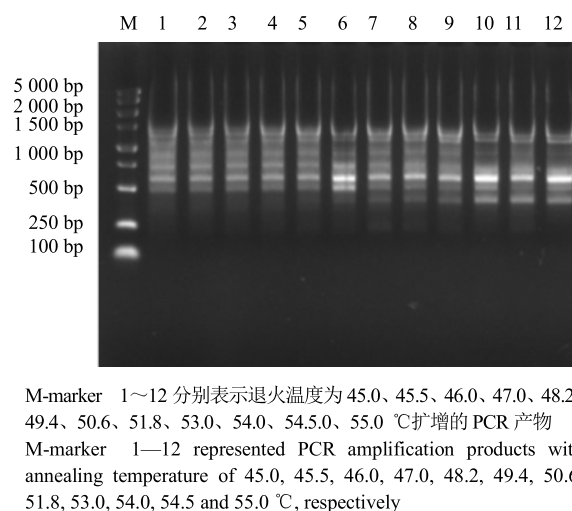


图 2 温度梯度扩增电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results for PCR amplification of gradient temperature

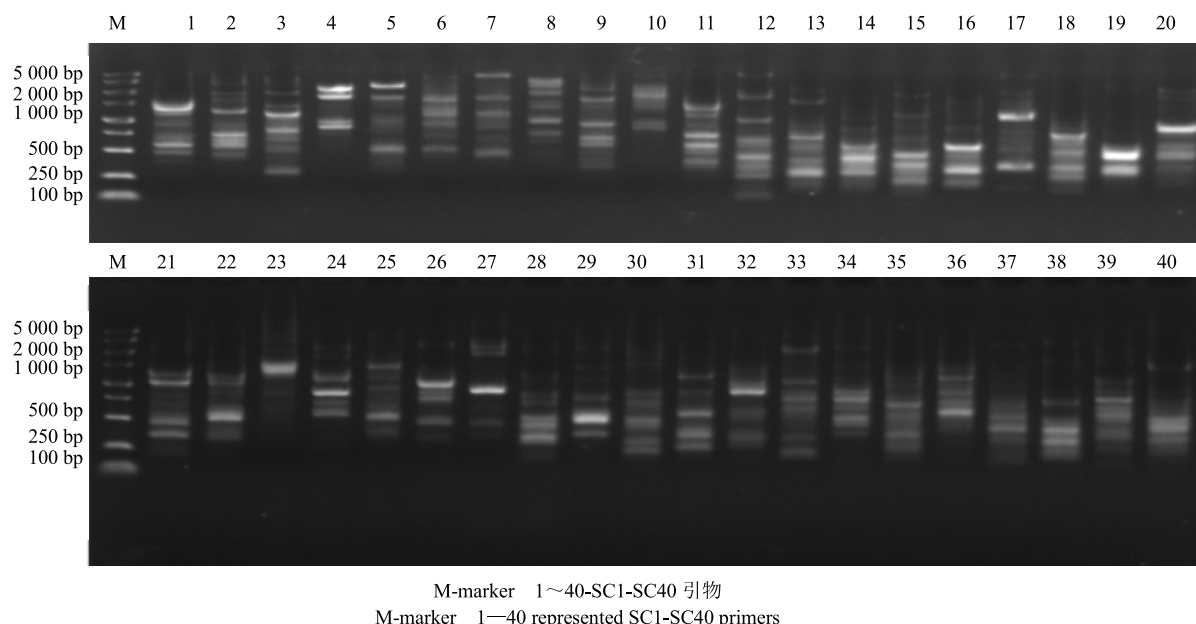


图 3 40 条 SCoT 引物筛选的电泳图

Fig. 3 Electrophoresis results for PCR amplification with 40 SCoT primers screening

3.3 血叶兰及其近缘属植物亲缘关系及多样性分析

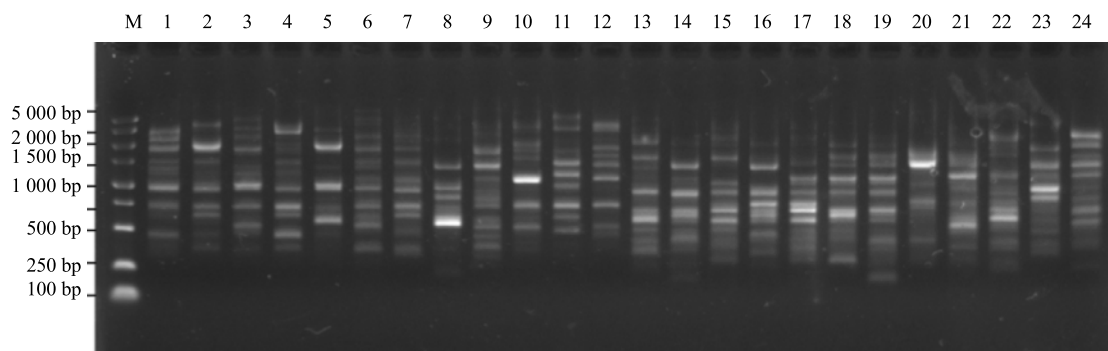
基于上述最优 PCR 反应体系 (Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, Taq 0.5 U, 引物 1 μ mol/L, 模板 70 ng), 最适退火温度 (49.4 $^{\circ}C$) 和最佳的 SCoT 引物 (表 3) 对 12 种血叶兰及其近缘属种质资源进行 PCR 扩增, 并依据电泳条带建立 01 矩阵。基于 SC8 和 SC9 引物扩增的 12 份种质资源电泳结果见图 4。

NTSYS 分析结果表明 (图 5), 8 号种质 (绿石蚕) 单独聚类为一个分支 (III 类群), 与其他种质 (血叶兰和金线兰) 均具有较远的亲缘关系, 在形态学方面, 绿石蚕茎秆呈绿色, 叶片上具 5 条白色的主脉, 主脉间具断续不规则的白色细脉, 背面淡绿色, 与其他种质形态差异较大, 极易辨认。主成分分析结果见图 6。

表 3 筛选的 SCoT 引物

Table 3 List of screened SCoT primers

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增片段数
SC2	CAACAATGGCTACCACCC	6
SC3	CAACAATGGCTACCACCG	6
SC8	CAACAATGGCTACCACGT	13
SC9	CAACAATGGCTACCAGCA	11
SC11	AAGCAATGGCTACCACCA	7
SC12	ACGACATGGCGACCAACG	6
SC13	ACGACATGGCGACCATCG	8
SC21	ACGACATGGCGACCCACA	6
SC24	CACCATGGCTACCACCAT	7
SC26	ACCATGGCTACCACCGTC	7
SC33	CCATGGCTACCACCGCAG	8
SC39	AACCATGGCTACCACCGC	9



1~12 泳道是基于 SC8 引物, 13~24 泳道是基于 SC9 引物扩增的 PCR 电泳条带。1~12 和 13~24 泳道扩增的模板均按照表 1 的顺序进行
1—12 lands and 13—24 lands were amplified bands by SC8 and SC9 primer, respectively. The template of 1—12 lands and 13—24 lands were listed in table 1

图 4 最佳反应体系的验证

Fig. 4 Verification of optimized reaction system using SC8 and SC9 primers

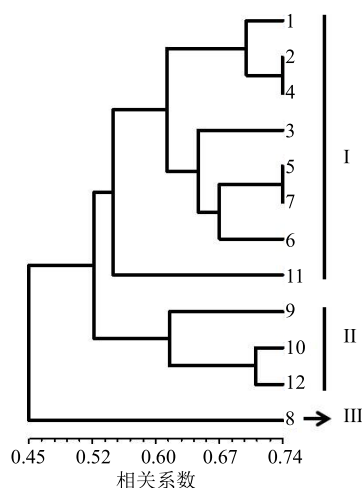


图 5 基于 NTSYS 方法构建的血叶兰及其近缘属种质资源亲缘关系分析

Fig. 5 Genetic relationship analysis of *L. discolor* and its relatives genus constructed by NTSYS method

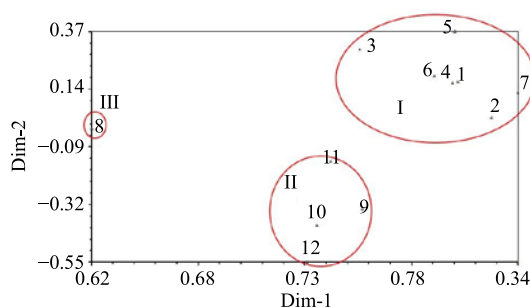


图 6 12 份种质资源的主成分分析

Fig. 6 PCA analysis of 12 germplasm resources

绿单银 (1 号)、绿五银 (2 号) 和绿密金 (4 号) 聚类为一个小分支, 结合绿密银 (3 号)、红单金 (5 号)、红五金 (6 号) 和红密金 (7 号) 共同归为 I 类群, 这些血叶兰种质在形态学上主要以茎秆颜色、主脉数量和细脉颜色分布等为依据加以命名和区分^[20]。结果表明, 分子标记聚类的结果与形态学分类基本一致, 然而茎秆为墨绿色的绿密银 (3 号) 在聚类图中与茎秆为黑红色的种质归在一起, 且相关系数介于二者之间。此外, I 类群还有一个重要的分支, 即 11 号 (斑叶兰) 种质, 斑叶兰与 I 类群的其他种质遗传距离相对较远, 遗传距离为 0.54, 形态差异也较大, 该种质茎秆直立, 呈绿色, 叶片上面为绿色, 具白色不规则的点状斑纹, 背面淡绿色。在 UPMGA 做出的树状图中, 发现台湾银线兰 (莲)、浙江金线兰 (莲) 与越南金线兰 (莲) 聚为 II 类群, 即图中的 9、10 和 12 号种质。采用 popgene

对 12 份种质资源的遗传多样性进行分析, 结果表明, 平均 N_e 为 1.8828, 遗传多样性指数为 0.467 8, 香农指数为 0.660 4。

3.4 血叶兰及其近缘属植物 DNA 指纹图谱构建

从筛选的 12 条 SCoT 引物中选择多态性最好的核心引物 SC8 构建 12 份血叶兰及其近缘属种质资源的指纹图谱 (图 7)。该引物可鉴别所有供试种质, 在品种鉴定方面, 仅需通过 SC8 引物对待测的血叶兰种质资源进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, 通过比对该材料的多态性与构建的 DNA 指纹图谱, 从而确定该 12 份种质中的具体品系。

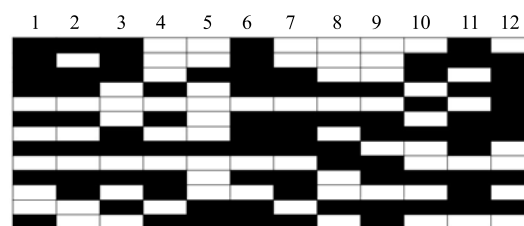


图 7 基于 SC8 引物扩增结果的 12 份血叶兰及其近缘属植物资源 DNA 指纹图谱

Fig. 7 DNA fingerprint map of 12 *L. discolor* and its relatives genus samples based on SC8 primer amplification results

4 讨论

SCoT 是 Collard 和 Mackill 基于植物基因中的 ATC 翻译起始位点侧翼序列的保守性而新开发的一种目的基因分子标记^[11]。为单引物, 与 ISSR 标记、RAPD 标记不同的是 SCoT 分子标记是一种目的基因分子标记, 其本身可能是目的基因的一部分或与目的基因紧密连锁; 另外其使用的引物长度较 RAPD 标记长, 理论上比 RAPD 标记重复性好; 同时还具有引物设计简单、操作简单、成本低廉和多态性高等特点^[11-13]。目前已有大量植物的遗传多样性和亲缘关系的相关研究被报道。叶伟等^[14]利用 ISSR 标记对不同地区收集的金线兰及近缘种植物亲缘关系分析发现, 在相似系数 0.65 处, 50 份材料可归为 4 个类群, 按不同地理来源则可分成 8 个种群。席秀利等^[15]采用 SCoT 方法对 22 个居群的白芍样品进行亲缘关系分析, 发现不同产地白芍具有丰富遗传多样性, 且该方法能有效区分不同产地的白芍品种。邬龙怡等^[16]通过正交设计获得最佳的化橘红 SCoT 标记 PCR 体系和相应的 SCoT 引物, 研究发现不同品系化橘红归为一个分支, 而种内品系间具有较高的相似系数 (大于 0.75), 因此表明

SCoT 可以有效运用于化橘红的种内亲缘关系分析和品种鉴定研究。陈伯伦等^[7]基于 17 份猕猴桃品系资源,采用 SCoT 对其进行遗传多样性和变异分析,结果表明,筛选出的 SCoT 引物扩增的平均多态性比率为 95.1%。17 份猕猴桃材料间的平均遗传距离值为 0.492,在遗传距离为 0.460 的水平上,17 份材料可分为 4 组。SCoT 标记可以用于猕猴桃性状变异的初步鉴定,为进一步开展变异新品种早期鉴定提供技术支持。Safari 等^[17]采用 ISSR 和 SCoT 方法对 18 种木犀属植物种间亲缘关系进行评价,结果表明,与 ISSR 标记相比,SCoT 分子标记能更好地分离材料。而该调查种质资源具有较高的种间多样性。Jalilian 等^[17]利用 SCoT 标记结合形态学特征对 30 份梨属植物资源亲缘关系和种群结构进行研究。形态学特征在不同的研究样本间表现出较大变异,基于这些特征进行分类也能明确区分不同的物种。12 条 SCoT 引物共产生 83 个片段,多态性达到 95.9%,同时还观察到一些片段与果实性状之间存在高度相关性。此外,SCoT 分子标记也在茶枝柑,辣木和地黄等多种具药用价值的植物中验证了其反应体系的稳定可靠^[18-23]。

血叶兰是珍贵的药用植物,随着人工采摘不断加剧,野生资源收集难度较大,因而在外形上与金线兰相似,因而常出现品种混杂现象。本研究对资源圃中收集的 12 份形态差异的血叶兰和金线兰资源进行 SCoT 扩增,旨在从分子水平揭示这些种质的亲缘关系,建立各品系的指纹图谱(DNA 身份证),为后续种质资源鉴定提供技术参考。本研究建立了血叶兰属植物的 SCoT-PCR 扩增体系,筛选其最佳的 SCoT 引物,并扩增获得供试的 12 份种质(包含 7 份血叶兰、3 份金线兰和 2 份未知样品)的多态性条带,并进行亲缘关系分析和 DNA 指纹图谱构建。本研究采用正交实验对血叶兰 SCoT-PCR 的多个因素进行优化,结果表明,dNTP 是最为关键的因素,这与林艺华等^[23]在辣木上的研究结果一致,但其他因素及反应量因物种不同而存在差异,这也是在 SCoT 扩增前需对反应体系进行优化的原因。本研究筛选的 12 条 SCoT 引物在血叶兰资源中具有较高的多态性,平均多态性比率为 98.94%,高于该方法在茶树品种^[24]和兰属植物^[25]的多态性百分比。然而,这些特异性的条带是否与表型性状关联还需要进一步证实。

种群的多样性关系着物种的生存与进化,分布

较广的物种常具有较高的基因多样性^[26-28]。秦朋^[29]对 21 份不同地区来源的金线兰及其近缘种样本总体多样性为 0.3,叶炜等^[14]将不同来源的金线兰及近缘种划分为 8 个种群,总体的遗传多样性为 0.322,而本实验中,12 份种质资源的遗传多样性为 0.4678,这可能是因为本研究采用的样本至少涉及血叶兰属和开唇兰属,而其他 2 项研究仅对开唇兰属内不同种质的多样性分析。这在系统进化树的相似系数方面进一步证实,如本研究中血叶兰属和开唇兰属的遗传距离相对较远,相似性系数在 0.45~0.52,而金线兰及其近缘种的相似系数则在 0.65 左右^[14]。此外,在本研究中,血叶兰属 7 个种质归为一簇,与斑叶兰具有较近的亲缘关系,而 3 份金线兰种质单独聚为一个分支,在形态上差异显著的绿石蚕与其他种质的相似系数仅为 0.45,单独形成一簇。因此,本课题组认为斑叶兰也是属于血叶兰属的一种植物资源,而绿石蚕则是异于血叶兰和金线兰的第 3 种资源,当然由于供试的品系数量较少,这些种质的分类地位还需进一步证实。

依据本研究引物扩增的结果显示,通过核心引物 SC8 即可区分这 12 份种质,因此 SCoT 分子标记是作为血叶兰及其近缘属植物鉴定较为可信的一种分子标记方法。主成分分析图与聚类结果完全一致,同时也与形态学分类基本相似。血叶兰植物目前多集中在离体繁殖,产品开发,资源收集阶段,对分子标记方法对种质资源品系鉴定极少涉及,基于上述 SCoT 方法在血叶兰属分类和图谱构建上的优越性,因此本研究对于血叶兰属植物分类的研究具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 林振兴. 观赏南药资源血叶兰的研究进展 [J]. 福建热作科技, 2012, 37(2): 4-5.
- [2] 沈贤娟, 黄泽豪. 民间药公石松的文献考证 [J]. 中药材, 2015, 38(3): 629-631.
- [3] 张泽宏, 洪丽纯, 孙连青. 药用经济植物公石松的资源调查及开发利用 [J]. 宜宾学院学报, 2014, 14(6): 46-48.
- [4] 陈 裕, 林坤瑞, 管其宽. 野生花叶开唇兰、大斑叶兰资源调查研究初报 [J]. 亚热带植物通讯, 1990(2): 61-63.
- [5] 编写组编全国中草药汇编. 全国中草药汇编-下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [6] 张汝国, 王小果. 血叶兰的开发利用研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(16): 44-46.

- [7] 陈伯伦, 张 晋, 黄继魁, 等. SCoT 分子标记在猕猴桃遗传多样性分析与变异鉴定上的应用 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(1): 77-86.
- [8] 苏亚春, 凌 辉, 王恒波, 等. 甘蔗 SCoT-PCR 反应体系优化与多态性引物筛选及应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 810-818.
- [9] 熊发前, 蒋 菁, 钟瑞春, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用 [J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2055-2061.
- [10] 郑 涛, 林艺华, 蔡坤秀, 等. 闽粤血叶兰野生种质资源引种研究初报 [J]. 福建热作科技, 2018, 43(2): 1-5.
- [11] Collard B C Y, Mackill D J. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 86-93.
- [12] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [13] 龙治坚, 范理璋, 徐 刚, 等. SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 336-343.
- [14] 叶 炜, 江金兰, 李永清, 等. 金线兰及近缘种植物遗传多样性 ISSR 分子标记分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1045-1054.
- [15] 席秀丽, 胡 珊, 邬龙怡, 等. SCoT 分子标记对不同产地白芍亲缘关系的研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(6): 658-662.
- [16] 邬龙怡, 胡 珊, 杨志业, 等. SCoT 分子标记对不同品种化橘红的亲缘关系分析 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(6): 12-16.
- [17] Safari H, Zebajadi A, Kahrizi D, *et al.* The study of inter-specific relationships of *Bromus* genus based on SCoT and ISSR molecular markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46: 5209-5223.
- [18] Jalilian H, Zarei A, Erfani-Moghadam J. Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers [J]. *Sci Hortic*, 2018, 235: 323-333.
- [19] Golkar P, Nourbakhsh V. Analysis of genetic diversity and population structure in *Nigella sativa* L. using agronomic traits and molecular markers (SRAP and SCoT) [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 130: 170-178.
- [20] 席秀丽, 黄海波, 楼步青, 等. SCoT 分子标记对茶枝柑及近缘种遗传多态性分析 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2426-2431.
- [21] 史卫东, 琚茜茜, 张 力, 等. 菜心种质资源遗传多样性的 SCoT 分析 [J]. 南方农业学报, 2015, 46(8): 1350-1355.
- [22] 杨 珂, 周延清, 段红英, 等. 地黄 SCoT 分子标记体系的建立和指纹图谱的构建 [J]. 广西植物, 2019, 39(5): 608-614.
- [23] 林艺华, 郑 涛, 蔡坤秀, 等. 辣木 SCoT-PCR 反应体系建立和引物筛选 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(13): 4344-4349.
- [24] 林伟东, 陈志丹, 孙威江, 等. 基于 SCoT 标记的福建茶树品种 (系) 遗传多样性分析 [J]. 茶叶科学, 2018, 38(1): 43-57.
- [25] 高 岭, 冯尚国, 何仁锋, 等. 兰属植物目标起始密码子 (SCoT) 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2026-2032.
- [26] Yu H, Yang Z, Sun B, *et al.* Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms [J]. *Biochem Systemat Ecol*, 2011, 39(2): 71-78.
- [27] 徐刚标, 吴雪琴, 蒋桂雄, 等. 濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 255-261.
- [28] 陈 虎, 颜培栋, 杨章旗. 海南霸王岭南亚松天然林群落遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 706-712.
- [29] 秦 朋. 金线莲遗传多样性和有效成分分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.